

11. Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, and Sata T: Lack of Human Herpesvirus 8 Infection in Lungs of Japanese Patients with Primary Pulmonary Hypertention. *J Infect Dis* 191: 743-745, 2005

12. Nakai T, Hatano K, Ikeda F, and Shibuya K: Electron Microscopic Findings for Micafungin-Treated Experimental Pulmonary Aspergillosis in Mice. *Med Mycol* (in press)

2. 学会発表

1. Shibuya K: Pathophysiology of invasive fungal infections. Asian Roundtable Meeting, Serious Fungal Infection: An Asian Perspective, Tokyo, 2004. 4

2. 室孝明, 丸山優, 佐瀬道郎, 岡田恵美, 菰田拓之, 平田晶子, 渋谷和俊, 野中博子: 広範囲びまん性に生じた皮下石灰沈着症の1例, 第13回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2004, 4

村山琮明, 花沢良, 渋谷和俊, 生方公子: 輸入シロフクロウ臓器内真菌要素の in situ hybrid-ization (ISH) 法による同定. 第77回日本細菌学会総会, 大阪, 2004, 4

3. 秦美暢, 高木啓吾, 加藤信秀, 笹本修一, 田巻一義, 竹山照明, 片柳智之, 松田聡, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 成人先天性嚢胞性腺腫様奇形(CCAM)の1手術例, 第21回日本呼吸器外科学会総会, 横浜, 2004. 5

4. 大塚創, 加藤信秀, 笹本修一, 秦美暢, 和田真一, 田巻一義, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 縦隔原発脂肪肉腫の1切除例, 第21回日本呼吸器外科学会総会, 横浜, 2004.

5

5. 田中仁英, 岡田隆之, 大谷隆俊, 鯉淵清人, 武藤篤彦, 知念輝, 宮城盛淳, 酒井謙, 相川厚, 小原武博, 水入苑生, 渋谷和俊, 石川由起雄, 長谷川昭: 微少変化群(MCNS)の早期再発例の臨床的特徴, 第47回日本腎臓学会学術集会, 栃木, 2004, 5

6. 渡邊利泰, 竹内基, 片桐正人, 中野茂, 神田映子, 渡辺学, 五十嵐良典, 住野泰治, 三木一正, 徳山隆之, 池田正視, 柴忠明, 浜谷茂治, 渋谷和俊: 16歳胃癌の1例, 第67回日本消化器内視鏡学会総会, 京都, 2004, 5

7. 知念輝, 田中仁英, 新井兼司, 酒井謙, 渋谷和俊, 水入苑生, 長谷川昭: 胃癌術後に発症したMRSA腎炎の1例, 第47回日本腎臓学会学術集会, 栃木, 2004, 5

8. 秦美暢, 渋谷和俊, 加藤信秀, 笹本修一, 田巻一義, 浅野久敏, 高橋祥司, 長谷川千花子, 高木啓吾: 胸腺上皮性腫瘍手術例の検討. 第21回日本呼吸器外科学会総会, 横浜 2004, 5

9. 水入苑生, 川村毅, 宮城盛敦, 新井兼司, 酒井謙, 相川厚, 小原武博, 渋谷和俊, 石川由起雄, 川村貞夫, 長谷川昭: 原病FGS例における腎移植後蛋白尿と治療. 移植腎病理研究会, 東京, 2004, 5

10. Hirata A, Maruyama Y, Onishi K, Hayashi A, Shibuya K: A vascularized artificial bone graft using a periosteal flap and prous hydroxyapatite; experimental study and preliminary clinical application. 7th Korea and Japanese Society of Plastic and Reconstructive Surgery, Sapporo, 2004, 6

11. 中村博志, 岩崎維和夫, 渡邊 聖, 麻生敬子, 橋本卓史, 徳山美香, 佐藤真理, 青木美憲, 渋谷和俊: 頭蓋内出血, 肺出血にて発症し, 治療に難渋した先天性胆道閉症(CBA)の 1 例, 第 41 回日本小児外科学会総会, 大阪, 2004. 6
12. 土田恭代, 廣井直樹, 渋谷和俊, 芳野原: 原発性肺腺癌の両側副腎転移により両側副腎出血と急性副腎不全を呈した一例, 第 77 回日本内分泌学会学術総会, 京都, 2004, 6
13. 宮城盛淳, 酒井 謙, 北野敬造, 知念 輝, 田中仁英, 北原信三, 渋谷和俊, 水入苑生, 長谷川昭: 経皮的副甲状腺エタノール注入療法 (PEIT) 後副甲状腺の組織学的変化, 第 49 回日本透析医学会学術集会・総会, 神戸, 2004, 6
14. 高橋祥司, 加藤信秀, 浅野久敏, 秦 美暢, 笹本修一, 高木啓吾, 羽鳥 努, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 気管狭窄に対し気道再建を施行した 1 例, 第 27 回日本呼吸器内視鏡学会総会, 大阪, 2004. 6
15. 高橋敬二, 浜谷茂治, 長谷川千花子, 渋谷和俊, 村山琮明: 隆起型大腸腫瘍に関する病理組織学的検討 (第 2 報). 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004, 6
16. 若山 恵, 渋谷和俊, 安藤常浩, 大原関利章, 横内 幸, 高橋 啓, 直江史郎: 腎カンジダ症と組織内真菌 DNA 定量量的解析の試み 抗真菌剤治療歴の有無による比較検討. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004, 6
17. 村山琮明, 渋谷和俊: 侵襲性アスペルギルス口内炎患者の口腔内組織から検出された真菌要素の in situ hybridization 法による同定. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004, 6
18. 長谷川千花子, 渋谷和俊, 野中博子, 浜谷茂治, 加藤信秀, 高木啓吾, 岡田克典, 近藤 丘: 肺リンパ管筋腫症にて肺移植術を施行された一剖検例. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004, 6
19. 片野晴隆, 伊藤金次, 渋谷和俊, 佐地 勉, 佐藤由子, 佐多徹太郎: 原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004, 6
20. Shibuya K: What Happen behind Radiographs? -Pathophysiology and Histological Diagnosis of Invasive Fungal Infection-. National Symposium of Fungal Infection, Peking, China, 2004. 7
21. Hirata A, Maruyama Y, Hayashi A, Imaizumi R, Shibuya K: Bone formation in porous hydroxyapatite block induced by an attachment of rib-latissimus dorsi periosto-muscle flaps in rabbit. The 2nd World Union of Wound Healing Societies' Meeting, Paris, France, 2004, 7
22. 三宅洋子, 前田陽子, 池津暢子, 浜谷茂治, 長谷川千花子, 中田紘一郎, 内田耕, 渋谷和俊: 当施設における過去 6 年間の呼吸器系細胞診検体にて確認しえた真菌について, 第 45 回日本臨床細胞学会総会, 東京, 2004, 7
23. 小林照明, 田辺なおみ, 緒方美和子, 前田陽子, 長谷川千花子, 浜谷茂治, 奥山伸男, 渋谷和俊: 嚢胞を伴う乳癌の 6 例 嚢胞穿刺液の細胞像, 第 45 回日本臨床細胞学会総会, 東京, 2004, 7

24. 佐藤龍太, 高井雄二郎, 宮崎泰斗, 瀧口貴子, 廣田直, 磯部和順, 廣井真弓, 外山勝弘, 清水邦彦, 内田耕, 中田紘一郎, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 乳癌の放射線治療後に発症したBOOPの1例. 第160回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2004, 7
25. Ohta K, Ando T, Morimoto S, Ikushima S, Oritsu M, takemura T, Shibuya K: Twelve cases of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. ADVANCES AGAINST ASPERGILLOSIS, San Francisco, U. S. A., 2004. 9
26. Ando T, Ohta K, Morimoto S, Ikushima S, Oritsu M, takemura T, Shibuya K: Two case of mold infection indicated similar clinical manifestation to pulmonary aspergillosis. ADVANCES AGAINST ASPERGILLOSIS, San Francisco, U. S. A., 2004. 9
27. 胡偉民, 石橋弘子, 渋谷和俊, 植村浩一, 山口英世, 安部茂: 吸入ステロイド剤によるマウス咽頭カンジダ症. 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004, 9
28. 秦美暢, 高木啓吾, 加藤信秀, 笹本修一, 浅野久敏, 高橋祥司, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 嚢胞内ドレナジが有効であった感染性巨大嚢胞の1切除例. 第131回日本胸部外科学会関東甲信越地方会, 東京, 2004, 9
29. 菅又美穂, 渋谷和俊, 植村浩一, 安部茂, 内田勝久, 山口英世: 動物園飼育下のコアラから分離されたクリプトコックス症起因菌のマウスに対する病原性の比較. 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004, 9
30. 菅又美穂, 渋谷和俊, 植村浩一, 西山彌生, 安部茂, 内田勝久, 山口英世: 本邦動物園飼育下のコアラから分離されたクリプトコックス症起因菌の真菌学的諸性状. 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004, 9
31. 村山琮明, 横山耕治, 遠藤成朗, 西村和子, 渋谷和俊: In situ hybridization (ISH)法による組織内 *Aspergillus flavus* の特異的検出. 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004, 9
32. 渡邊利泰, 飯田和成, 生馬晶子, 山澤養志子, 萩澤良美, 佐久間紀子, 佐藤大介, 五十嵐良典, 三木一正, 丸山憲一, 山崎和子, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 胆嚢癌により発症した急性胆嚢炎の1例. 日本超音波医学会第15回関東甲信越地方会学術集会, 東京, 2004, 10
33. 田巻一義, 高木啓吾, 大塚創, 秦美暢, 笹本修一, 加藤信秀, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 原発不明の肺悪性黒色腫の1例, 第45回日本肺癌学会総会, 横浜, 2004. 10
34. 浅野久敏, 笹本修一, 加藤信秀, 秦美暢, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 1ヵ月の経過で腫瘤影が増大した肺性肥大性骨関節症合併肺癌の1例, 第45回日本肺癌学会総会, 横浜, 2004. 10
35. 和泉春香, 名取一彦, 長瀬大輔, 藤本吉紀, 奥田慎也, 石原晋, 菅澤康幸, 荒井ちあき, 加藤元浩, 浜谷茂治, 渋谷和俊, 梅田正法, 倉石安庸: 造血器悪性疾患と大腸癌からなる重複癌 当科15例の検討, 第42回癌治療学会総会, 2004, 京都, 2004, 10
36. 平田晶子, 丸山優, 林明照, 室孝

- 明, 今泉りさ, 渋谷和俊: 骨膜圧着多孔性ハイドロキシアパタイト気孔内の骨および血管新生に関する組織学的検討. 第13回日本形成外科学会基礎学術集会, 千葉, 2004, 10
37. 平田晶子, 丸山 優, 林 明照, 渋谷和俊: 血管柄付き骨膜と多孔性ハイドロキシアパタイトによる骨形成に関する組織学的検討. (主題演題), 第13回日本形成外科学会基礎学術集会, 千葉, 2004, 10
38. 杉野圭史, 木村一博, 遠藤高広, 廣井眞弓, 外山勝弘, 高井雄二郎, 清水邦彦, 山城義広, 内田耕, 中田紘一郎, 秦美暢, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊: サルコイドーシスと塵肺との鑑別が困難であった1症例, 第24回サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会, 京都, 2004. 10
39. 浅野久敏, 笹本修一, 加藤信秀, 秦 美暢, 高橋祥司, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊: 肺性肥大性骨関節症を合併した原発性肺癌の臨床的検討, 第45回日本肺癌学会総会, 横浜, 2004. 10
40. 渋谷和俊: 深在性真菌症の病理. 第15回日本臨床微生物学会総会 (シンポジウム), 筑波, 2004, 1
- 佐々木久美子, 前田陽子, 前田 明, 渋谷和俊, 浜谷茂治, 長谷川千花子, 羽鳥 努, 野中博子: 呼吸器系細胞診検体での簡易グロコット法の改良, 第15回日本臨床細胞学会秋期大会, 東京, 2004, 11
41. 齊藤宗樹, 高橋 寛, 和田明人, 岡島行一, 勝呂 徹, 渋谷和俊: 特発性脊髄肥厚性硬膜炎の1例, 第39回日本脊髄障害医学会, 東京, 2004. 11
42. 平田晶子, 丸山 優, 林 明照, 渋谷和俊: 骨膜圧着多孔性ハイドロキシアパタイト気孔内における組織形成に関する検討. 第34回日本創傷治癒学会, 金沢, 2004. 11
42. Hirata A, Maruyama Y, Hiruma M, Makimura K, Shibuya K: Histological study of onychomycosis developed in fingers of amputated foots. Focus on Fungal Infections 15, Miami, USA. 2005. 3
43. 大牟田絢子, 渋谷和俊, 松橋正和, 内田勝久: 実験的内因性真菌性網脈絡膜炎の病理学的検討について. 第109回日本眼科学会総会. 京都. 2005. 3
44. Omuta J, Shibuya K, Matsushashi M, Uchida K, Yamaguchi H.: Pathophysiological study on experimental endophtalmitis due to blood stream infection of Candida albicans. Focus on Fungal Infections 15. Miami, USA. 2005. 3
45. Ando T, Ohta K, Morimoto T, Ikushima S, Oritsu M, Shibuya K: Fifteen cases of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. Focus on Fungal Infections 15, Miami, USA. 2005. 3
46. Sugamata M, Shibuya K, Makimura K, Nishiyama Y, Abe S, Uchida K, Yamaguchi H: Biological nature of Cryptococcus neoformans isolated from zoo-stock koala in Japan. Focus on Fungal Infections 15, Miami, USA. 2005. 3

造血器悪性腫瘍患者における真菌感染の診断・治療法の開発

分担研究者 上 昌広 国立がんセンター中央病院 薬物療法部 医員

A: 研究目的

幹細胞移植患者の晩発性糸状真菌感染の実態調査。

B: 研究方法

12 の移植施設に調査用紙を送付し、深在性真菌症と診断された患者の病歴・起炎菌・CT 画像を調査した。合計 27 例の深在性真菌感染が報告された。

深在性真菌感染症の診断基準は、EORTC/MSK 規準を用い、Probable, definite case を「深在性真菌感染例」と定義した。

C: 研究結果

全 27 例がアスペルギルス感染症であった。その患者背景・アスペルギルス感染の臨床像を表 1、2 に示す。24 例が急性、あるいは慢性 GVHD を有していた。全 27 例に副腎皮質ステロイドホルモンが投与されていた。

胸部 CT 画像所見は、以下の通りであった。halo 15 例、centrilobular nodules 14 例、ill-defined consolidation 13 例、ground-glass attenuation 11 例、pleural effusion 10 例、pleural-based consolidation 7 例、cavitation 5 例、air-crescent sign 2 例。

CT 画像に基づき、アスペルギルス感染症は 3 群に分類された。Halo sign を呈する血管侵襲性タイプと centrilobular nodules を呈する気管支肺炎タイプ、および両方の所見を呈する混合タイプである。27 例中、11, 8, 4 例が各群の診断基準を満たした。血管侵襲性タイプ 11 例中 2 例、気管支肺炎タイプ 8 例中 1 例が、混合タイプに進展した。4 例の CT 所見は非特異的であった。血管侵襲性タイプと気管支肺炎タイプの臨床像の比較を表 3 に示す。両群の患者背景に明らかな差はなかったが、予後は気管支肺炎

群のほうが予後が不良であり、この差は統計的に有意であった。

20 例が死亡し、そのうち 9 例はアスペルギルス感染が主たる死因であった。1 年生存率は 28.1%(95% 信頼区間 10.7-45.5%)であった。予後因子解析を表 4 に示す。

D: 考察

本研究は骨髄移植患者の晩期感染症の中心はアスペルギルスであることを示した。また、その臨床像は移植後早期に生じるものとは異なる。Halo サインは好中球減少期におけるアスペルギルス感染症の代表的所見として有名だが、晩発性アスペルギルス感染における頻度・役割は不明である。本試験は 12 例に halo サインを認め、この CT 所見が晩期感染でも重要な所見であることを示した。

本試験は晩期感染では、気道がアスペルギルス感染の標的になることを示した。アスペルギルスによる気道感染としては 2 つのタイプが存在することが知られている。bronchopneumonia と tracheobronchitis である¹⁵。アスペルギルスによる気管感染は、侵襲性アスペルギルス感染の 10%と報告されており、本研究の高い頻度とは対照的である¹⁵。アスペルギルスによる気管支肺炎は通常の画像検査では、細菌性肺炎と鑑別が不可能である。このことは、骨髄移植後に好中球が回復している患者が肺炎を生じた場合、アスペルギルス感染の可能性を考慮しなければならないことを示唆し、従来の移植医の常識と反する。

晩期アスペルギルス感染と気管支肺炎の関係については、いくつかの仮説が考えられる。まず、好中球低下時期のアスペルギルス感染と同様に halo サインはアスペルギルス感染の早期所見であ

り、アスペルギルス感染が進行して始めて気管支肺炎像を呈する可能性が考えられる。我々は移植後の肺合併症の診断のために早期にCTを撮影している。このため、晩発性アスペルギルス感染も早期に診断され、halo sign でとどまっている患者の予後が良好なのかもしれない。しかしながら、多くの患者ではhaloと気管支肺炎像を合併しなかったことは、この可能性を支持せず、晩発性アスペルギルス感染症

は2つの異なる病型を有する可能性が高い。この差が真菌、あるいは患者サイドの何れの要因に起因するかに関しては、今後の検討が必要である。GVHDを発症し、副腎皮質ステロイドホルモンを投与されている患者では、たとえ好中球数が回復していても、マクロファージや細胞性免疫機能が低下している。このような因子が関係するのかもしれない。今後、このような要因に関する基礎的検討が必要である。

Table 1. Backgrounds of patients with late invasive aspergillosis

Variables		n=27
Age	median (range)	50 (22-70)
Sex	male/female	20/7
Underlying diseases	acute myeloid leukemia	5
	acute lymphoblastic leukemia	9
	chronic myelogenous leukemia	4
	myelodysplastic syndrome	3
	malignant lymphoma	5
	others	1
History of invasive aspergillosis prior to transplantation	yes/no	2/25
Risk for transplantation ^{*1}	low/high	7/20
Stem cells	peripheral blood/bone marrow	16/11
HLA	matched/mismatched	25/2
Donor	related/unrelated	19/8
Preparative regimens	reduced-intensity ^{*2} /myeloablative ^{*3}	11/16
GVHD prophylaxis	cyclosporine alone	9
	cyclosporine and methotrexate	19
	tacrolimus and methotrexate	5
	cyclosporine and prednisolone	1

Table 2: Clinical characteristics of patients with invasive aspergillosis

Variables		N=27
IPA category	proven/probable	4/23
Onset (day after transplantation)	median (range)	104 (27-973)
Acute GVHD	0-1/2-4	3/12
Chronic GVHD	limited/extensive/none	0/12/0
Use of corticosteroid*3	yes/no	27/0
Dose of corticosteroid (mg/kg)	<0.5/0.5-1.0/>1.0	13/9/5
Number of neutrophils (/μL)	median (range)	2250 (610-20400)
Number of lymphocytes (/μL)	median (range)	450 (20-10100)
ECOG performance status	0-1/2-4	6/21
Antifungal prophylaxis	fluconazole/none	2/25
Treatment*1	deoxycholate amphotericin B	19
	liposomal amphotericin B	2
	itraconazole	5
	none	1
Response to antifungal therapy*2	responded/no change/ progression	11/11/4
Mortality within 30 days of IA diagnosis		7

Table 3: Comparison between angioinvasive-type and bronchopneumonia-type invasive aspergillosis

Variables	Angioinvasive-type (n=11)	Bronchopneumonia-type (n=8)	p value
Pretransplant			
Age	52 (22-70)	47.5 (23-60)	0.39
Types (conventional vs. RIST)	5/6	7/1	0.15
Posttransplant			
Onset	82 (27-180)	84 (27-973)	0.65
Neutrophils (/μL)	3400 (1200-8300)	2000 (900-20900)	0.38
Lymphocytes (/μL)	700 (200-3200)	440 (200-10100)	0.43
GVHD (present vs. absent)	10/1	6/2	0.55
Survival	73%	25%	0.036*

Table 4. Univariate and multivariate analysis on overall survival after IA diagnosis

Univariate			
Factors		Relative risk (95% confidence interval)	P value
Age		1.03 (0.99-1.07)	0.15
Sex	Female vs. male	2.48 (0.86-7.15)	0.094
Performance status ^{#1}	0-1 vs. 2-4	0.53 (0.18-1.61)	0.26
Preparative regimen	myeloablative/reduced	0.63 (0.26-1.54)	0.32
Risk of primary diseases	High/low	1.37 (0.50-3.78)	0.54
Donor	alternatives vs. matched	2.56 (0.34-19.2)	0.36
GVHD at IA diagnosis ^{#2}	present vs. absent	2.30 (0.53-10.0)	0.26
Lymphocyte	per cubic millimeter	1.01 (0.97-1.04)	0.69
Neutrophils	per cubic millimeter	1.00 (0.98-1.01)	0.98
Bronchopneumonia	Yes vs. No	2.05 (0.83-5.03)	0.11
Angioinvasive CT findings	Yes vs. No	0.34 (0.13-0.87)	0.025*

Multivariate			
Age		1.06 (1.02-1.12)	0.012*
Centrilobular nodules	Yes vs. No	4.88 (1.61-14.7)	0.012*
Halo	Yes vs. No	0.29 (0.11-0.76)	0.0051*

E: 結論: 骨髄移植後の晩発性アスペルギルス感染症は、気管支肺炎として発症することがあり、予後不良である。

F: 健康危険情報: 骨髄移植を行った患者が気管支肺炎を発症したときには、アスペルギルス感染の可能性を考慮すべきである。

G: 研究発表

Murashige N, Kami M, et al. False-positive results of Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assays for a patient with gastrointestinal graft-versus-host disease taking a nutrient containing soybean protein.

Clin Infect Dis. 2005 Jan 15;40(2):333-4.

Kami M, et al. Fungal prophylaxis following reduced-intensity stem cell transplantation (RIST)

Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2004;45(4):189-202.

Kobayashi K, Kami M, et al. Breakthrough zygomycosis during voriconazole treatment for invasive aspergillosis. Haematologica. 2004 Nov;89(11):ECR42

Kojima R, Kami M, et al. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic

stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. Biol Blood Marrow Transplant. 2004 Sep;10(9):645-52.

Imataki O, Kami M, et al. A nationwide survey of

deep fungal infections and fungal prophylaxis after hematopoietic stem cell transplantation in Japan. Bone Marrow Transplant. 2004 Jun;33(12):1173-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況：
なし

研究要旨 国内の洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノサンプルの菌相解析を行った。80 サンプルから非培養法を用いて *Histoplasma* sp. の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。また、グアノ中に存在する酵母の菌相を解析したところ、約 80% の洞窟から *Trichosporon* が分離された。しかもその中に 7 種の新種が含まれていた。*Trichosporon* は夏型過敏性肺臓炎の原因抗原である。そこで入洞に伴う呼吸器症状との関連性を明らかにするため、入洞経験者と未経験者(A 地方および B 地方)の血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体を測定・比較した。入洞経験者は未経験者(B 地方)に比べて有意に高い抗体価を示した。理由は不明であるが A 地方の入洞未経験者は経験者と差がなかった。また、グアノから分離された *Trichosporon* 株の血清型と入洞者血清の特異抗原への反応性には相関性が認められたことから、入洞者は *Trichosporon* 抗原に感作されていると推定された。今後はさらに検査対象を広げて調査する必要がある。

A. 研究目的

Histoplasma capsulatum を起因菌とするヒストプラズマ症は主要な輸入真菌症の一つであるが、国内感染と推定される症例が少ない。また、動物における国内感染例も報告されている。このことから *Histoplasma* は我が国に存在している可能性が考えられる。南米を中心とした環境調査から本菌はコウモリあるいはその堆積糞(グアノ)からしばしば分離されている。本研究では、前年度に引き続き我が国に *Histoplasma* が存在するか否かを調べるために様々な地域の洞窟・風穴から採取されたグアノから *Histoplasma* の検出を非培養法を用いて行なった。また、前年度のグアノの菌相解析から *Trichosporon* が高頻度に検出されることを明らかにした。*Trichosporon* は夏型過敏性肺臓炎の原因抗原である。そこで入洞に伴う呼吸器症状との関

連性を明らかにするため、入洞経験者と未経験者の血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体を測定・比較した。

B. 研究方法

1) コウモリ・グアノサンプル

本研究班分担研究者である東京女子医科大学感染症対策科菊池賢先生より分与頂いた 80 サンプルを実験に供した。

2) *Histoplasma* の検出

約 1 g のグアノにブレインハート インフュージョンブロースを加え 27°C で 3 日間培養、および滅菌生理食塩に懸濁し、真菌 DNA を抽出した。ITS 領域上に、*H. capsulatum*、*H. duboisii* および *H. farciminosus* の 3 変種に共通な DNA 塩基配列を見出し特異プライマーを作製した。Nested PCR 後、陽性 PCR 産物は TA クローニングを行い、DNA 塩基配列を決

定した。なお、PCRの特異性は、*Histoplasma* 保存株のDNA(分担研究者 榎村浩一先生より分与)を用いて確認した。

3) グアノサンプル中の真菌相解析

約0.5 gのグアノにYMブロー(含、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール)を加え27℃で1日培養し、培養液を同寒天培地に塗抹した。得られた酵母様コロニーのITS1-5.8S-ITS2-D1/D2 26S rDNA塩基配列解析を行ない、当該菌株の同定を行なった。

4) 血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体の検出

Trichosporon 抗原(血清型 I, II, III, I-III)に対する反応性をスライド凝集反応により測定した。なお、血清は入洞経験者100例、入洞未経験者(A地方34例、B地方48例)から所定の手続きを経て得た(分担者:菊池賢先生より)。

C. 研究結果

1. *Histoplasma* の検出

80サンプルについて *Histoplasma* の検出を非培養法で試みたが、本検出条件下では *Histoplasma* DNAは検出できなかった。

2. グアノサンプル中の真菌相解析

20の洞窟から採取したグアノから約700の酵母を分離し、rDNAシーケンスから菌株を同定した。担子菌系酵母として、*Trichosporon prosum*、*T. laibachii* および unknown *Trichosporon* spp.、*Cryptococcus podzolicus*、子囊菌系酵母は、*Candida palmioleophila*、*C. lusitaniae*、*Debaryomyces hansenii*、

Hansenispora sp.、*Saccharomyces cerevisiae*、*Williopsis californica*、および *Zygosaccharomyces florentinus* が分離・同定された。*Trichosporon* の分離頻度を Fig. 1 に、それ以外の酵母の分離頻度を Fig. 2 に示す。特に *Trichosporon* spp. は20洞窟中17と高頻度に分離された。また、50%の洞窟から新種に相当する菌種も分離された。分離された *Trichosporon* spp. は、Ovoides clade 以外のすべての clade に広く分布していた (Fig. 3)。

3. 抗 *Trichosporon* 特異抗体の検出

抗体価は便宜的に反応性に応じて0-7までにスコアー化した (Fig. 4)。また、抗体陽性率を Fig. 5 に示す。入洞経験者は未経験者(B地方)より有意に抗体が検出された。特に、III型および I-III型抗原に対する反応性が高く、I型にはわずかに、また II型には反応しなかった。A地方の未経験者は入洞経験者と同程度かそれ以上の検出率を示した。

D. 考察

本試験では、前年度に引き続き関東から九州に至る洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノ中の *Histoplasma* の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。南米を中心とした環境調査からコウモリあるいはそのグアノ中からの分離例は多く報告されていることから、今後も継続して分離を試みる必要があると思われる。

Histoplasma は分離できなかったものの、大部分の洞窟から担子菌系酵母 *Trichosporon* spp. が分離された。*Trichosporon* spp. は我が

国固有のアレルギー疾患とされている夏型過敏性肺臓炎(SHP)の原因抗原でもある。本菌は、血清学的には4型(I, II, III, I-III型)に大別され、その血清型は分子系統樹上のcladeと相関する。SHP患者家屋から分離される菌株の大部分はI型あるいはII型であり、III型およびI-III型はほとんど分離されない(Fig. 6)。一方、グアノからはII型を除いてすべての血清型株が分離された(Fig. 3)。Fig. 7にSHP患者家屋およびグアノから分離された菌株の血清型を比較して示した。

Trichosporon spp. はSHPの原因抗原であるため、入洞に伴う呼吸器症状との関連性が示唆された。入洞経験者の約30%から*Trichosporon*抗体が検出された。特にIII型抗体の検出率が高くII型は検出されなかった。これは、グアノ中の菌相結果とよく相関することから、入洞経験者は洞窟内で*Trichosporon*抗原に感作されている可能性が考えられた。A地方在住の入洞未経験者についても入洞経験者と同様の抗体検出パターンであった。

E. 結論

今回解析したサンプルからは*Histoplasma*は検出出来なかった。渡航歴のないヒストプラズマ症患者が報告されていることから、更に継続した広範囲な調査が必要である。また、大部分の洞窟にSHP原因抗原である*Trichosporon*が存在することが明らかになった。入洞者から抗*Trichosporon*抗体が検出されたことから、本菌と入洞に伴う呼吸器症状との関連性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(原著、総説、書籍)

1. Ichikawa T, Sugita T, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K, Nishikawa A. Phenotypic switching and HexNAcase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. *Microbiol. Immunol.* **48**:237-242, 2004.
2. Koyama K, Ishino M, Takatori K, Sugita T, Kinoshita, Takahashi K. Phomactin H, a novel diterpene from an unidentified marine-derived fungus. *Tetrahedron Lett.* **45**:6947-6948, 2004.
3. Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* **48**:579-583, 2004.
4. Arai R, Sugita T, Nishikawa A. The anthracycline antitumor agents doxorubicin and daunorubicin reduce the activity of *Candida albicans* phospholipase B. *Microbiol. Immunol.* **48**, 665-667, 2004.
5. Sugita T, Takeo K, Ohkusu M, Virtudazo E, Takashima M, Asako E, Ohshima F, Harada S, Yanaka C, Nishikawa A, Majoros L,

- Sipiczki M. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. *Microbiol. Immunol.* **48**, 761-766, 2004.
6. Sugita T, Tajima M, Amaya M, Tsuboi R, Nishikawa A. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* **48**, 755-759, 2004.
7. Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5467-5471, 2004.
8. 荒井隆雄、藤ヶ崎純子、荒川秀樹、長島弘泰、常喜達裕、村上成之、遠藤泰彦、福田隆浩、杉田隆、阿部俊昭. 中枢神経系 histoplasmosis の 1 剖検例. *脳と神経* **56**, 795-800, 2004.
9. Ersoz G, Otag F, Erturan Z, Aslan G, Kaya A, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of *Dipodascus capitatus* infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 248-252, 2004.
10. Arai R, Sugita T, Nishikawa A. Reassessment of the *in vitro* synergistic effect of fluconazole with the nonsteroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. *Mycoses* **48**, 38-41, 2005.
11. Sugita T, Takeo K, Hama K, Virtudazo E, Takashima M, Nishikawa A, Kucsera J, Dorogi J, Komori S, Nakagaki K, Vollekova A, Slavikova E, Farkas V. DNA sequence diversity of intergenic spacer 1 region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med. Mycol.* **43**, 21-26, 2005.
12. Lapandic T, Sugita T, Middelhoven WJ, Herzberg M, Fell JW, Zelger S, Prillinger H. *Trichosporon caseorum* sp. nov. and *Trichosporon lactis* sp. nov., two basidiomycetous yeasts isolated from cheeses. *Frontiers in Basidiomycete Mycology*, eds by Agerer R, Piepenbring M, Blanz P. pp.99-116, 2004, IHW-Verlag, Eching, Austria.
13. 杉田隆、西川朱實. DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. *日本医真菌学会雑誌* **45**, 55-58, 2004.
- H. 知的財産権の出願特許状況
なし。

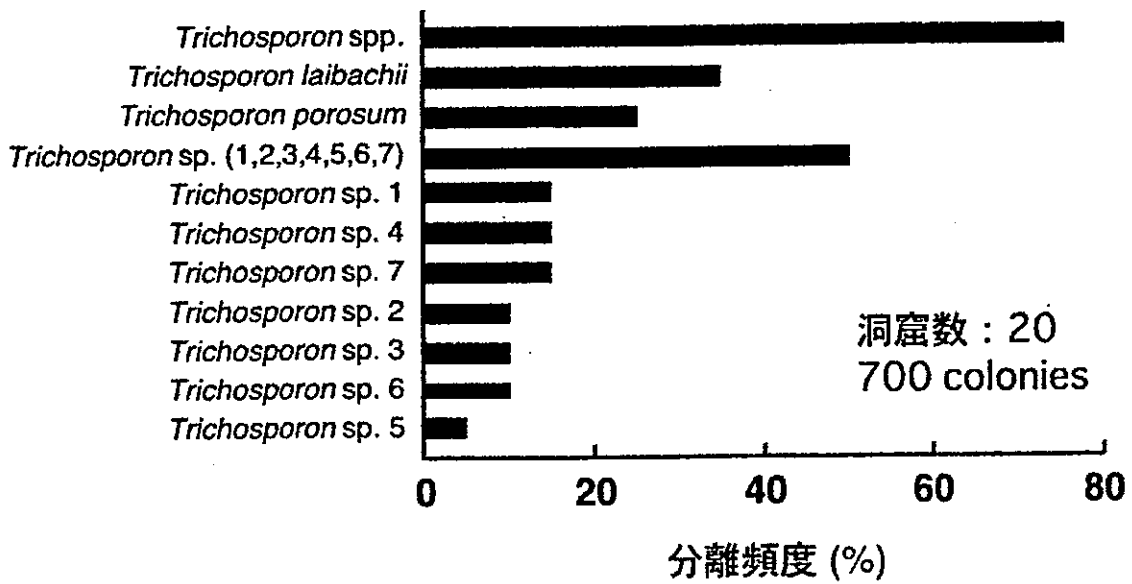


Fig. 1. コウモリグアノからの *Trichosporon* spp. の分離頻度

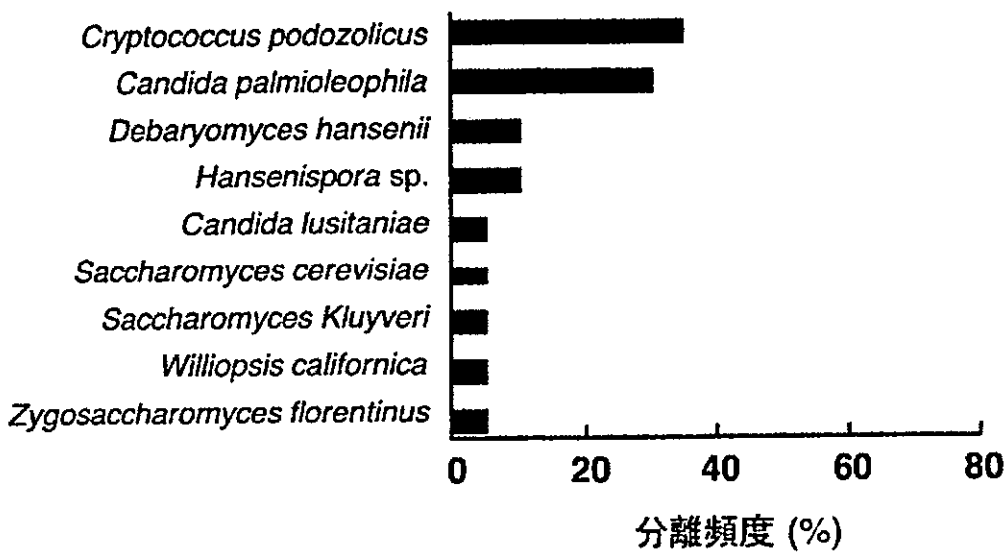


Fig. 2. コウモリグアノからの *Trichosporon* spp. 以外の酵母の分離頻度

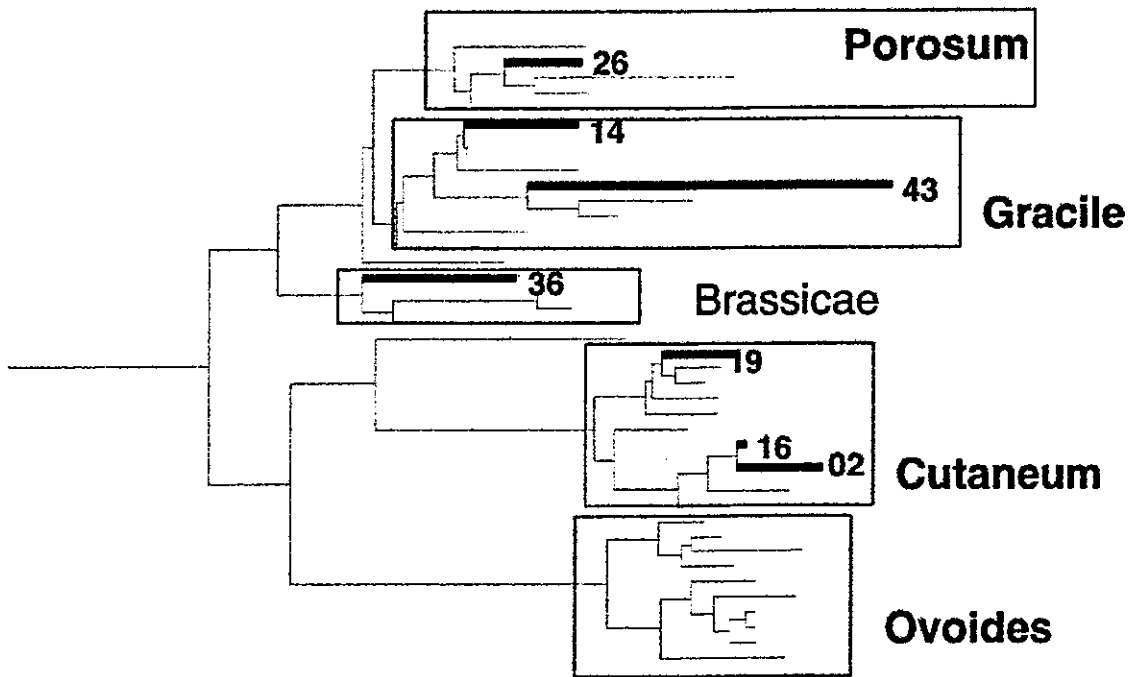


Fig. 3. 新種 *Trichosporon* spp. の系統学的位置
数字が新種株。

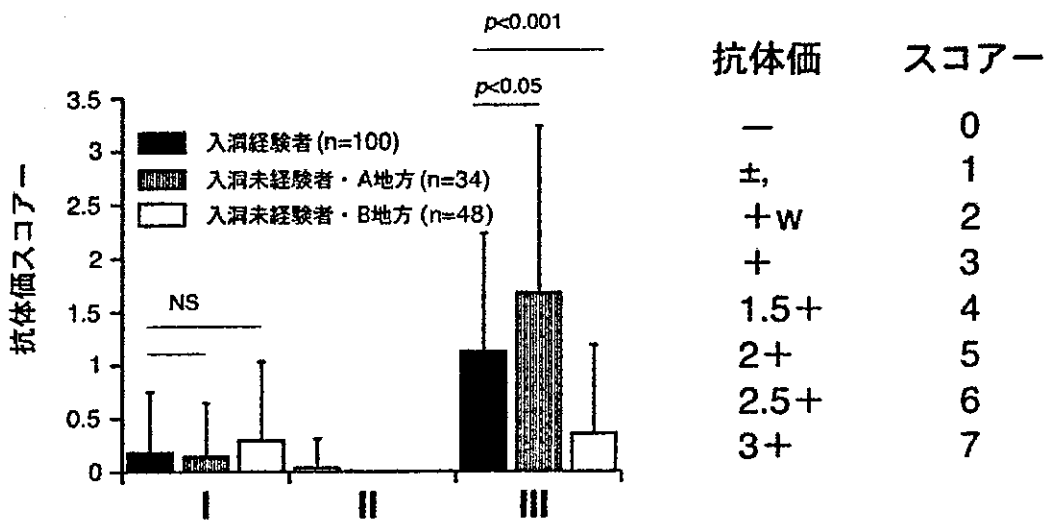


Fig. 4. 入洞経験・未経験者血清中の抗 *Trichosporon* 抗体価

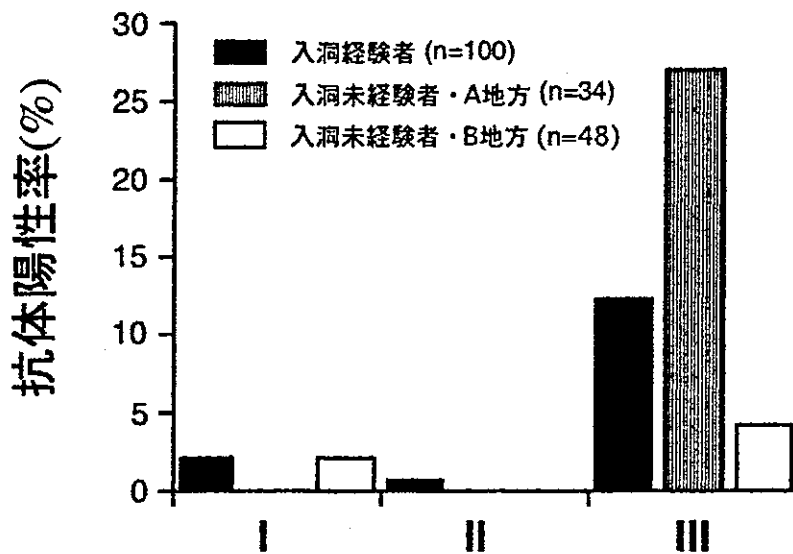


Fig. 5. 入洞経験・未経験者血清中の抗 *Trichosporon* 抗体価

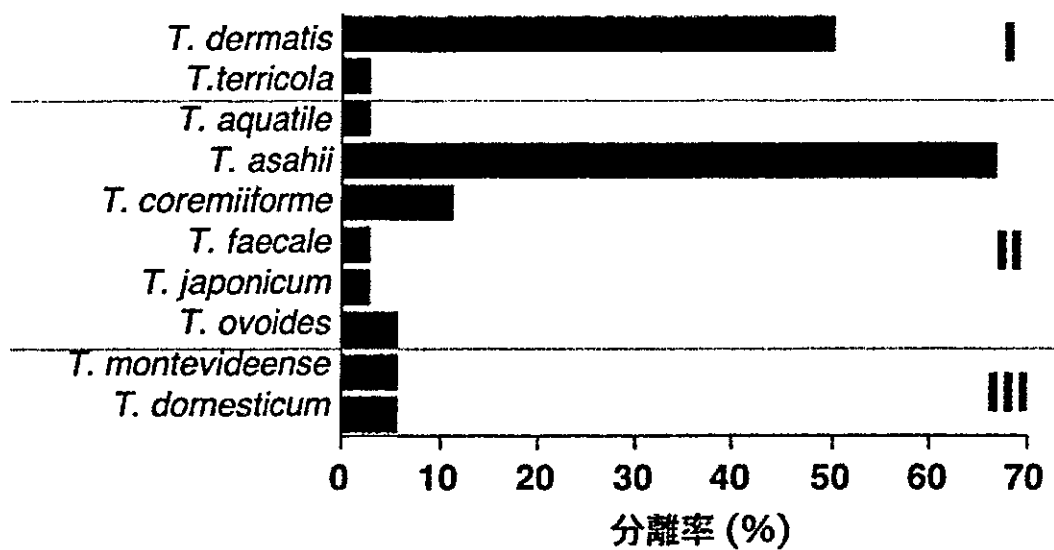


Fig. 6. 夏型過敏性肺臓炎患者家屋からの *Trichosporon* spp. の分離頻度

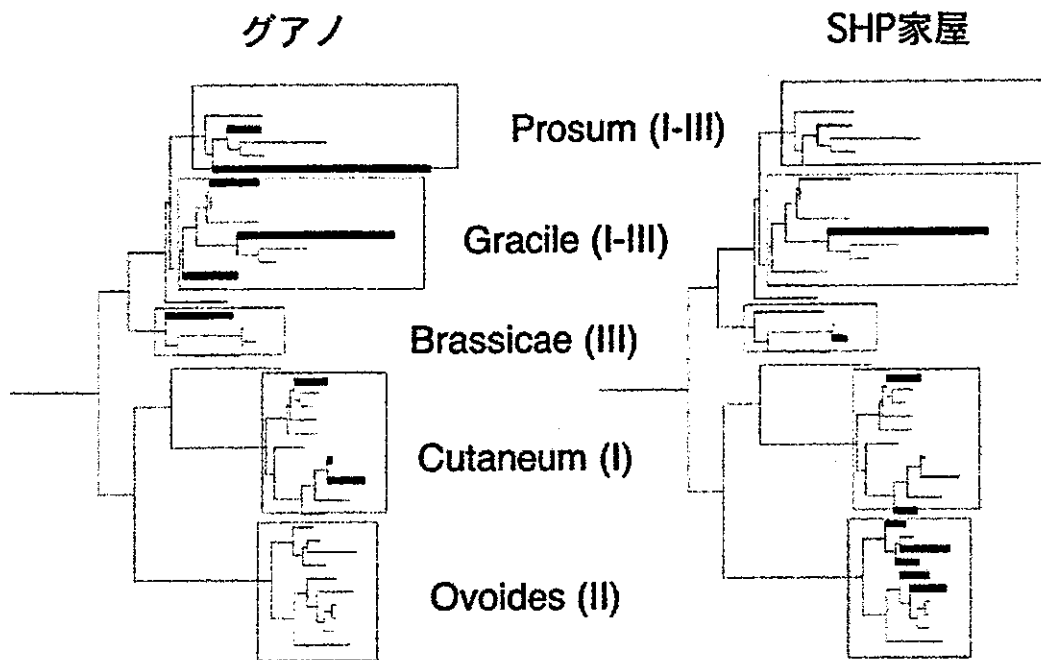


Fig. 7. グアノとSHP患者家屋から分離された *Trichosporon* spp. の菌相の比較
 太字の系統枝が分離された菌種を示す。菌株の血清型は()内に示した。

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究要旨 真菌由来糖たんぱく質によっておこる炎症によって惹起される血管炎の初期応答を解析した。CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) 投与直後、血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認め、好中球機能の活性化—活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認めた。また、投与直後から、末梢白血球・好中球数は著しく増加し、好中球の活性化が関与していることが示唆された。これらのことから、サイトカインと連動した活性化好中球が産生する活性酸素によって血管傷害が進行する可能性が示唆された。

A. 研究目的

真菌感染防御は、自然免疫、獲得免疫によって維持されている。感染初期には、好中球、マクロファージが主要な役割を担っている。特に、好中球が産生する活性酸素 O₂⁻ や OCI⁻ は、主要な役割をしている。すでにわれわれは、OCI⁻ 部の産生酵素 Myeloperoxidase (MPO) 欠損マウス (MPO-KO) により、真菌感染に必須であることを証明した (Aratani et al. 1998)。また、重篤な O₂⁻ 産生不全（慢性肉芽腫症）は、NADPH オキシダーゼ欠損であり、*Aspergillus* 真菌症から肉芽を造り、死亡する疾患である。真菌感染初期防御には、主として好中球がかかわり、なかでも好中球ライソゾーム酵素 myeloperoxidase (MPO) が H₂O₂ と Cl⁻ を基質として OCI⁻ を産生し強力に *Candida albicans* を殺菌することを、MPO 欠損マウスを用いて証明した。このように真菌、特に、*C. albicans* の不活性化には、MPO は不可欠である。

さらに、これまで、殺真菌の要因が、単純に、O₂⁻ 産生不全によっているとされていたが、MPO-KO と NADPH オキシダーゼの構成酵素 gp91-phox の欠損 (gp91-KO) のダブルノックアウトマウスと各単独ノックアウトマウスの実験結果から、真菌感染抵抗には、O₂⁻ そのものより OCI⁻ が主要であることを明らかにした (Aratani et al. *J. Infectious Diseases* 182, 1276-1279, 2000)。すなわち、O₂⁻ 産生不全は、その下流にある OCI⁻ を

も産生できず、単独の作用と考えられていたが、ノックアウトマウスの結果から、以上の結論を得た。

一方、このように MPO が産生する OCI⁻ は、自己組織を傷害することがあり、感染が誘導する組織傷害をもたらす。真菌に由来する分子などによって、腎炎、冠状動脈炎をはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。また、難治性血管炎の主たる死因が、*Candida* 感染症や *Aspergillus* 感染症がトップに挙げられているなど、難治性血管炎と真菌の関係は深い。すなわち、上記に記した殺菌酵素 (MPO や NADPH オキシダーゼ) の不全による好中球機能の低下による日和見感染の結果が、*Candida* 症や *Aspergillus* 症を誘発し、難治性血管炎もその例外ではないと思われる。このように、MPO が大量に細胞外に放出されることにより MPO 自己抗体の上昇などを誘発することにもなりかねない。事実、*C. albicans* 由来分子 CADS (Murata et al. *Microbiol. Immunol.* 23:825-831, 1979; Takahashi et al. *Inflamm. Res.* 53:72-77, 2004) や CAWS (Nagai-Miura et al. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26: 527-543, 2004) が MPO-ANCA を増加させ、冠状動脈炎を誘発する。

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura et al. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)。このよう

な好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症要因への可能性が強く示唆されている。これらの自己免疫疾患などには、活性化好中球や病態マーカーとして臨床検査として広く利用されている好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が病態と相関し、血管炎を誘導する *C. albicans* 由来分子が mannose-protein-1,3- β -glucan であることを示してきた。

そこで、本研究では、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein (CAWS) による誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。CAWS 投与初期の反応について調べ、血管炎誘導にいたる要因について解析した。

B. 研究方法

1) CAWS によるマウス血管炎発症の病理学的解析

C57BL/6 マウス (4.5 w オス) に、CAWS 4mg/0.2mL/mouse を腹腔内に接種し、その直後から心採血(ヘパリン処理)・解剖し採血後、以下の項目について測定した。各臓器は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

3) マウス血清中の MPO-ANCA 値

マウス MPO の ELISA により測定した。

4) CAWS 投与直後の血液像、炎症反応、血漿中のサイトカインの経時的変動の解析

CAWS 4 mg を ip 投与直後 10 分から 16 時間まで、心臓からヘパリン採血し、血漿、血球を分離した。血中細胞数、血漿中のサイトカインを ELISA 法により定量した。また、好中球機能の経時的な変動を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) CAWS 投与直後好中球機能の活性化

好中球機能のうち、活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認めた。一方、*in vitro* において CAWS を直接好中球活に添加しても活性化は認めなかった。

2) CAWS 投与直後サイトカイン変動

また、CAWS 誘導の血管炎発症初期のサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と

活性化に伴い、血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。

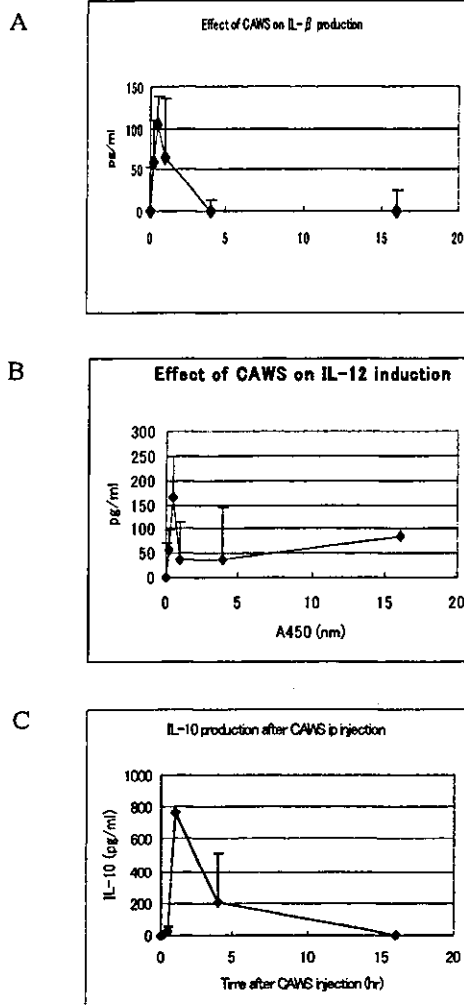


図 1. CAWS 投与直後サイトカイン変動
A: IL-1 β , B: IL12-p70, C: IL10

3) CAWS 投与直後の血液像の変動

CAWS 投与直後 10 分から、末梢血球数は著しく増加し、特に好中球は、数、割合共に増加が顕著であった。

D. 考察

本研究では、CAWS による血管炎誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。CAWS 投与初期の反応について調べ、血管炎誘導にいたる要因について解析した。

CAWS 投与直後好中球機能の活性化: 好中球機能のうち、活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認めた。これは、血管傷害に関与する活性酸素の産生がかかわっている可能性を示唆している。

CAWS 投与直後サイトカイン変動: また、CAWS

誘導の血管炎発症初期に好中球の活性化が関与しており、これらを調節しているサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と活性化に伴い、血清中のIL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。

CAWS 投与直後の血液像の変動: CAWS 投与直後 10 分から、末梢血球数は著しく増加し、特に好中球は、数、割合共に増加が顕著であったことから、初期に好中球の活性化が関与していることが示唆された。

本研究は、大川原明子 (国立感染研)、高橋啓 (東邦大・医・大橋病院・病理)、大原関利章 (東邦大・医・大橋病院・病理)、三浦典子 (東京薬大・薬)、直江史郎 (東邦大・医・大橋病院・病理)、大野尚仁 (東京薬大・薬)、荒谷康昭 (横浜市大・木原生物研) の各先生方の協力によった。

E. 結論

本年度の結果は、CAWS 投与直後サイトカイン変動—CAWS 誘導の血管炎発症初期に血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。CAWS 投与直後から、末梢白血球・好中球数は著しく増加し、初期に好中球の活性化が関与していることが示唆された。CAWS 投与直後好中球機能の活性化—活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認め、血管傷害に関与する活性酸素の産生がかかわっている可能性を示唆している。以上から、CAWS 投与直後好中球機能の活性化にともなうサイトカイン IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の増加が発症に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol. Immunol.* 49: 181-189, 2005.
2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells *Microbiol. Immunol.* 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of

CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.

4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S12-13, 2004
5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S15, 2004
6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S17-18, 2004
7. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4 in CD11b^{high}CD8⁻ dendritic cell development *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:8981-8986, 2004.
8. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol., Dial. Transplant.* 19:1708-1715, 2004.
9. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
10. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.

和文発表

1. 鈴木和男「パイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」医学のあゆみ 210 巻 171
2. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」医学のあゆみ 210 巻 196-199
3. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング *PharmaMedica*22: 185-189, 2004 (医療薬学雑